

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-236986

(43)Date of publication of application : 17.09.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/00  
// C12N 15/09

(21)Application number : 03-208322

(71)Applicant : NIPPON SANZO KK

(22)Date of filing : 20.08.1991

(72)Inventor : YOKOYAMA SHIGEYUKI  
KIKAWA TAKANORI  
TEJIMA MUNEHIO

## (54) PRODUCTION OF STABLE ISOTOPE-LABELED PROTEIN AND REAGENT KIT

## (57)Abstract:

PURPOSE: To simply and inexpensively obtain the labeled substance in which only an arbitrary atom of an arbitrary specific amino acid residue has been labeled in a perfect labeling rate; by performing the synthesis of the labeled substance in the presence of an amino acid labeled with a stable isotope as a substrate in a cell-free protein synthesis system.

CONSTITUTION: A substrate solution containing a labeled amino acid labeled with a stable isotope such as  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$  is continuously fed into a cell-free protein synthesis system (synthesis system) and a flowing-out solution containing the produced protein is simultaneously taken out to continuously obtain the objective protein. A cell-free translation system such as the emolytic system of a rabbit reticulocyte is preferable as the synthesis system. In an activity-lowered synthesis system except the protein synthesis system, the labeled protein is preferably prepared by a method comprising culturing cells or bacteria to be taken out from the synthesis system under a condition rich in the amino acids, lowering the activities except the protein synthesis system and subsequently separating the protein from the cells or bacteria.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.07.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3145431

[Date of registration] 05.01.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP I are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein which is the approach of taking out the effluent which contains the protein generated from this system of reaction, supplying continuously the substrate solution which contains amino acid in a cell-free-protein-synthesis system, and manufacturing the purpose protein continuously, and is characterized by including at least one kind of indicator amino acid in which the indicator was carried out to said substrate by stable isotopes, such as  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ .

[Claim 2] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 1 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system in which enzyme activity other than protein synthesizing systems, such as an amino-acid-biosynthesis system and an amino acid metabolic system, was reduced as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 3] as said cell-free-protein-synthesis system -- amino acid -- the manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 2 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system extracted from the bacteria or cell cultivated under rich conditions.

[Claim 4] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 2 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system which added the inhibitor to an amino-acid-biosynthesis system and an amino acid metabolic system as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 5] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 2 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system extracted from the bacteria or cell into which the amino-acid-biosynthesis system, the amino acid metabolic system, etc. suffered a loss as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 6] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 2 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system except an amino-acid-biosynthesis system, an amino acid metabolic system, etc. by the monoclonal antibody as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 7] The manufacturing method of the stable isotope indicator protein according to claim 2 characterized by using combining at least two or more sorts in a cell-free-protein-synthesis system according to claim 3 to 6.

[Claim 8] The reagent kit of the stable isotope indicator protein possessing the substrate containing at least one kind of indicator amino acid in which the indicator was carried out by stable isotopes, such as  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ , a cell-free-protein-synthesis system, and ribonucleotides, such as ATP, GTP, CPT, and UTP.

[Claim 9] The reagent kit of the stable isotope indicator protein according to claim 8 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system in which activity other than protein synthesizing systems, such as an amino-acid-biosynthesis system and an amino acid metabolic system, was reduced as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 10] as said cell-free-protein-synthesis system -- amino acid -- the reagent kit of the stable isotope indicator protein according to claim 9 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system extracted from the bacteria or cell cultivated under rich conditions.

[Claim 11] The reagent kit of the stable isotope indicator protein according to claim 9

characterized by using the cell-free-protein-synthesis system which added the inhibitor to an amino-acid-biosynthesis system and an amino acid metabolic system as said cell-free-protein-synthesis system.

[Claim 12] The reagent kit of the stable isotope indicator protein according to claim 9 characterized by using the cell-free-protein-synthesis system extracted from the bacteria or cell into which the amino-acid-biosynthesis system, the amino acid metabolic system, etc. suffered a loss as said cell-free-protein-synthesis system.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-236986

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 8214-4B

C 8214-4B

// C 1 2 N 15/09

審査請求 未請求 請求項の数14(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-208322

(22)出願日 平成3年(1991)8月20日

(71)出願人 000231235

日本酸素株式会社

東京都港区西新橋1丁目16番7号

(72)発明者 横山 茂之

東京都文京区向丘1-20-6-607

(72)発明者 木川 隆則

東京都台東区上野桜木1-5-2

(72)発明者 手島 宗広

東京都港区西新橋一丁目16番7号 日本酸

素株式会社内

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

(54)【発明の名称】 安定同位体標識蛋白質の製造法および試薬キット

(57)【要約】

【構成】 無細胞蛋白質合成系に、アミノ酸を含む基質溶液を連続的に供給しつつ、該反応系から生成した蛋白質を含む流出液を取り出して連続的に目的蛋白質を製造する方法であって、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>Nなどの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質を用いる安定同位体標識蛋白質の製造法。

【効果】 蛋白質に存在する20種類のアミノ酸残基のうち、任意の特定アミノ酸残基の任意の原子だけにほぼ100%の効率で安定同位体で標識された目的の標識蛋白質を安価に製造することができる。

(2)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 無細胞蛋白質合成系にアミノ酸を含む基質溶液を連続的に供給しつつ、該反応系から生成した蛋白質を含む流出液を取り出して連続的に目的蛋白質を製造する方法であって、前記基質に、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも 1 種類の標識アミノ酸を含むことを特徴とする安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 2】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などの蛋白質合成系以外の酵素活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 1 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 3】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸リッチの条件下で培養した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 2 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 4】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系に対する阻害剤を添加した無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 2 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 5】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などが欠損した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 2 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 6】 前記無細胞蛋白質合成系として、モノクローナル抗体によりアミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などを除いた無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 2 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 7】 請求項 3～6 記載の無細胞蛋白質合成系のうちの少なくとも 2 種以上を組み合わせ用いることを特徴とする請求項 2 記載の安定同位体標識蛋白質の製造法。

【請求項 8】  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも 1 種類の標識アミノ酸を含む基質と、無細胞蛋白質合成系と、ATP、GTP、CTP、UTPなどのリボヌクレオチドとを具備した安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 9】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などの蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 8 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 10】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸リッチの条件下で培養した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 9 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 11】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系に対する阻害剤を添加し

2

た無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 9 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 12】 前記無細胞蛋白質合成系として、アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などが欠損した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 9 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 13】 前記無細胞蛋白質合成系として、モノクローナル抗体によりアミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などを除いた無細胞蛋白質合成系を用いることを特徴とする請求項 9 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

【請求項 14】 請求項 10～13 記載の無細胞蛋白質合成系のうちの少なくとも 2 種以上を組み合わせ用いることを特徴とする請求項 9 記載の安定同位体標識蛋白質の試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分子生物学および蛋白質工学の分野において使用される安定同位体標識蛋白質の製造法に係わり、より詳細には、蛋白質を安定同位体で標識し、核磁気共鳴装置などによりその蛋白質の立体構造や、その機能を解析する技術において、蛋白質のある特定の種類のアミノ酸残基のみ、もしくは全てのアミノ酸残基を標識する方法、およびその方法を行なうための試薬キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、分子生物学および蛋白質工学の分野においては、炭素  $^{13}\text{C}$ （以下 $^{13}\text{C}$ と記す）や窒素  $^{15}\text{N}$ （以下 $^{15}\text{N}$ と記す）などの安定同位体で蛋白質を標識し、この標識された蛋白質を用いて蛋白質の立体構造やその機能を解析する技術が知られている。また、このような安定同位体により標識された蛋白質の製造法についても、いくつかの例が知られている。

【0003】①目的の蛋白質を合成、分泌するバクテリア、動物細胞などの細胞が入手可能な場合には、その細胞を特定の安定同位体標識アミノ酸を含むアミノ酸混合培地で培養し、合成された目的の蛋白質を分離生成する。

【0004】②目的の蛋白質の遺伝情報をコードする塩基配列が分かっている場合には、遺伝子組み換えの手法により、その塩基配列をベクターに組み込み、そのベクターを宿主菌に導入し、目的の蛋白質を発現させ、目的の蛋白質を分離、精製する。この時、宿主菌として標識しようとするアミノ酸に対する要求性変異株を用い、培地中にその安定同位体標識アミノ酸を加えることにより、目的のアミノ酸残基が安定同位体で標識された蛋白質が得られる。

【0005】③全てのアミノ酸残基を標識する場合に、培地中の炭素源、窒素源、酸素源、水素源、硫黄源

(3)

3

などを安定同位体で標識したものに置換し、目的の蛋白質を合成する細胞、もしくは目的の蛋白質を合成するように形質転換された細胞を培養し、目的蛋白質を合成させ、次いで目的蛋白質を分離精製する。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の安定同位体標識蛋白質の製造法では、細胞内の蛋白質合成系を用いて蛋白質を合成しているために、次のような問題があった。

【0007】a. 蛋白質を合成する細胞がアミノ酸要求性変異株でない場合には、細胞自身がアミノ酸合成系を持つため、細胞内で新たに合成されたアミノ酸により安定同位体の標識化率が場合によっては40%程度まで低下する。

【0008】b. また、生体内では、アミノ酸の代謝経路が存在するため、標識した安定同位体が目的以外のアミノ酸に転移してしまう。特にアミノ基に標識した $^{15}\text{N}$ がアミノトランスフェラーゼにより転移することは顕著である。また、セリン $\longleftrightarrow$ グリシン $\longleftrightarrow$ スレオニン間の代謝反応も非常に頻繁に起こり、この3種のアミノ酸内の特定のアミノ酸のみを標識することは困難である。

【0009】c. また、遺伝子組み換えの手法を用いる場合には、遺伝子組み換えの一般的な問題点として、蛋白質の不溶化や、菌体内プロテアーゼによる蛋白質の分解などにより目的の蛋白質が得られないことがしばしば起こる。

【0010】d. また、培地として安定同位体標識アミノ酸を加えているため、目的の蛋白質合成以外に細胞増殖のためにもアミノ酸が消費される。このため、大量の安定同位体標識アミノ酸を必要とするため、得られる目的蛋白質は非常に高価なものとなってしまう。

【0011】一方、細胞内から蛋白質合成系を取り出した無細胞蛋白質合成系を用いて放射性同位体標識蛋白質を合成する技術は既に知られており、そのための試薬キットも市販されている。しかし、この反応に用いる無細胞蛋白質合成系は、従来からのバッチ式の反応系を用いているため極微量の蛋白質( $\mu\text{g}$ 以下)が合成可能なだけであり、放射性同位体を用いた系でなければ検出することができない。このため従来の技術では無細胞蛋白質合成系において、放射性同位体の代わりに安全性の高い安定同位体標識蛋白質を合成することは全く考えられていなかった。そして、既に市販されている試薬キットもバッチ式の無細胞蛋白質合成系において放射性同位体標識蛋白質を合成することのみを目的としており、連続式無細胞蛋白質合成系において安定同位体標識蛋白質を合成する目的には不適である。

【0012】本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、安定同位体標識蛋白質の合成において、蛋白質の不溶化や細胞内プロテアーゼによる分解を受けることなく、蛋白質に存在する20種類のアミノ酸残基のうち任

4

意の特定のアミノ酸残基の任意の原子だけにほぼ100%の標識化率で安定同位体が標識された目的の蛋白質が安価に、簡単にかつ必要充分量を得ることが可能な安定同位体標識蛋白質の製造法の提供を目的としている。

## 【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、無細胞蛋白質合成系にアミノ酸を含む基質溶液を連続的に供給しつつ、該反応系から生成した蛋白質を含む流出液を取り出して連続的に目的蛋白質を製造する方法であって、

$^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質を用いることを特徴とする安定同位体標識蛋白質の製造法によって上記課題を解消した。

【0014】また、前記安定同位体標識蛋白質の製造法は、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質と、無細胞蛋白質合成系と、ATP, GTP, CTP, UTPなどのリボヌクレオチドとを具備した安定同位体標識蛋白質の試薬キットに適用させることができる。

【0015】また、前記無細胞蛋白質合成系は、アミノ酸合成系、アミノ酸代謝系などの蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を用いることが望ましい。この蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系としては、アミノ酸リッチの条件下で培養した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系、アミノ酸合成系やアミノ酸代謝系に対する阻害剤を添加した無細胞蛋白質合成系、アミノ酸合成系やアミノ酸代謝系などが欠損した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系、モノクローナル抗体によりアミノ酸合成系やアミノ酸代謝系などを除いた無細胞蛋白質合成系の各種の無細胞蛋白質合成系の1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

## 【0016】

【作用】無細胞蛋白質合成系を用い、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質を連続的に供給して安定同位体標識蛋白質を製造することによって、蛋白質に存在する20種類のアミノ酸残基のうち、任意の特定アミノ酸残基の任意の原子だけにほぼ100%の標識化率で安定同位体が標識された目的蛋白質が安価に得られる。

## 【0017】

【実施例】本発明において好適に用いられる無細胞蛋白質合成系としては、ウサギ網状赤血球の溶血系、小麦胚芽抽出物などの無細胞翻訳系や、大腸菌S-30抽出物のような無細胞転写翻訳共役系などである。これらは主としてリボソーム、tRNAや蛋白質合成に必要な酵素等であり、20種類のアミノ酸を基質として蛋白質を合成するものである。

【0018】また、本発明では、上記無細胞蛋白質合成系に存在しているアミノ酸合成系、アミノ酸代謝系な

(4)

5

ど蛋白質合成系以外の活性を低下させたものが用いられる。蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を作製する方法としては、無細胞蛋白質合成系を取り出すべき細胞あるいは細菌を、アミノ酸リッチの条件下（通常の培養培地中のアミノ酸濃度の約10倍の濃度とした培地を用いる。）で培養し、細胞あるいは細菌体内のアミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系などの蛋白質合成系以外の活性を低下させた後、Zubayの方法

(Zubay G. (1973) Annu. Rev. Genet. 7, 267-287) などの従来より知られている無細胞転写翻訳共役系やtRNAの調製法などの技術を用い、細菌あるいは細胞から分離して利用する方法が好適に用いられる。

【0019】また、蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を作製する方法としては、上記方法以外に、

・無細胞蛋白質合成系にアミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系に対する阻害剤を添加する方法

・アミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系などが欠損した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いる方法

・アミノ酸生合成系、アミノ酸代謝系に対する抗体（モノクローナル抗体）を作製し、その抗体によりアミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系などを除いた無細胞蛋白質合成系を用いる方法

があり、これらの方法を単独あるいは2種以上の組み合わせによって、蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を得る。

【0020】また、本発明において用いられる基質としては、蛋白質を構成する20種類のアミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リシン、アルギニン、シスチン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、プロリン）のうちの少なくとも1種あるいは全ての種類のアミノ酸が、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された標識アミノ酸を含む基質溶液が用いられる。この基質溶液には、標識アミノ酸、非標識アミノ酸の他、ATP、GTP、CTP、UTP等のリボヌクレオチドなどが加えられる。

【0021】図1は、本発明に係わる安定同位体標識蛋白質の製造方法を実施するのに好適な製造装置の一例を示す図であって、符号1は反応槽、2は基質溶液タンク、3は流出液である。反応槽1内には、前述した蛋白質合成系以外の酵素活性を低下させた無細胞蛋白質合成系が収容されている。この反応槽1の下方側からは基質溶液タンク2から圧送された基質溶液が連続的に供給され、反応槽1の上部に取り付けられた限外ろ過器4を通して、反応槽1内で生成した標識蛋白質を含む流出液3が流出するようになっている。

6

【0022】この装置を用いて連続的に標識蛋白質を製造するには、反応槽1内に、目的蛋白質を合成するための無細胞蛋白質合成系を含む溶液を収容し、この反応槽1内に標識アミノ酸を含む基質溶液を連続的に圧送する。基質溶液を反応槽1内に圧送するには、系内に気相を含むことがなく、脈流が少なく、圧力と流量の制御が可能なポンプ、例えば高速液体クロマトグラフィー用ポンプ、中圧液体クロマトグラフィー用ポンプ、低压液体クロマトグラフィー用ポンプなどを用いて圧送することが望ましい。この基質溶液の圧送量は、通常は一定に設定されるが、反応時間の経過とともに圧送量を増加させあるいは減少させても良い。

【0023】反応槽1内に供給された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む20種類のアミノ酸は、無細胞蛋白質合成系の作用によって標識アミノ酸を含んだ標識蛋白質に生合成される。この標識蛋白質は、蛋白質を構成するアミノ酸のうちの少なくとも1種類が $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識されており、この標識アミノ酸残基はNMRを用いて検出することができる。

【0024】反応槽1内で生合成された標識蛋白質を含む流出液3は、限外ろ過器4を通して採取容器5に集められる。この限外ろ過器3は、反応槽1内に収容されたリボソームやRNA、酵素等の無細胞蛋白質合成系本体を透過させることなく、合成された標識蛋白質、基質あるいはその分解物（AMP、GMP、ポリリン酸塩、無機リン酸塩など）を透過させるような孔径を有するろ過材を備えたものが使用される。

【0025】上記基質溶液タンク2内の基質溶液は10℃以下の温度で保存されるのが望ましく、また、反応槽1内は20～40℃に保温するのが望ましい。また反応槽1内はマグネチックスターラーなどを用いて攪拌状態としても良い。

【0026】流出液3から標識蛋白質を分離精製する方法は、従来より知られている蛋白質の分離生成法が使用され、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法などが好適に用いられる。分離された標識蛋白質は、核磁気共鳴（NMR）などにより標識されたアミノ酸残基を検出し、その立体構造や機能を解析する技術において使用される他、代謝試験用試薬などの医療分野にも利用が可能である。

【0027】この安定同位体標識蛋白質の製造方法は、無細胞蛋白質合成系を用い、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質を連続的に供給して安定同位体標識蛋白質を製造することによって、蛋白質に存在する20種類のアミノ酸残基のうち、任意の特定アミノ酸残基の任意の原子だけにほぼ100%の標識化率で安定同位体が標識された目的の標識蛋白質を製造することができる。

【0028】次に、本発明に係わる安定同位体標識蛋白質

(5)

7

質の試薬キットについて説明する。この試薬キットは、  
①  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含むアミノ酸混合体（アミノ酸基質）

② 無細胞蛋白質合成系

③ ATP, GTP, CTP, UTPなどのリボヌクレオチド

とを具備して構成される。なお、これら①～③の材料の他、基質溶液のpHを調節するための緩衝液などを含めることができる。

【0029】蛋白質の構造解析などにおいては、標識アミノ酸の種類の異なる多種類の標識蛋白質が必要となる場合が多い。このような場合には、標識アミノ酸の種類を各種組み合わせた基質用アミノ酸混合体を用意することが望ましい。即ち、20種類のアミノ酸のうちの少なくとも1種類に標識アミノ酸を用いたアミノ酸混合体あるいは20種類のアミノ酸の全てに標識アミノ酸を用いたアミノ酸混合体である。1種類以上の標識アミノ酸を含むアミノ酸混合体は、多種類の組み合わせが考えられるが、通常は、20種類のアミノ酸のうちの1種類を標識アミノ酸とし、残りの19種類を非標識（天然型）アミノ酸としたアミノ酸混合体（20種類）、全ての種類のアミノ酸を標識アミノ酸としたアミノ酸混合体、全ての種類のアミノ酸を非標識（天然型）アミノ酸としたアミノ酸混合体という程度の組み合わせが用いられる。

【0030】上記無細胞蛋白質合成系は、蛋白質合成系以外の活性を低下させた無細胞蛋白質合成系を用いることが望ましい。このような無細胞蛋白質合成系は、アミノ酸リッチの条件下で培養した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系、アミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系に対する阻害剤を添加した無細胞蛋白質合成系、アミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系などが欠損した細菌または細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系、モノクローナル抗体によりアミノ酸生合成系やアミノ酸代謝系などを除いた無細胞蛋白質合成系の各種の無細胞蛋白質合成系の1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

【0031】この試薬キットにあつては、①アミノ酸混合体、②無細胞蛋白質合成系、③リボヌクレオチドは、それぞれ別容器に収容されるか、あるいは①アミノ酸混合体と③リボヌクレオチドを混合した基質と、②無細胞蛋白質合成系とを別容器に収容する。①アミノ酸混合体および③リボヌクレオチドは、水（緩衝液や酸溶液）に溶かした状態でも冷凍保存すれば比較的安定である。②無細胞蛋白質合成系は、細菌や細胞から抽出したリボソームやRNA、酵素等を含む液体であり、そのままの状態では短時間で劣化してしまうので、その保存は $-80^{\circ}\text{C}$ ～液体窒素中保存とするのが望ましい。

【0032】（実験例）図1に示す製造装置を構築し、標識蛋白質の合成を実施した。無細胞蛋白質合成系とし

8

ては、Zubayらの開発した大腸菌のS30抽出液を用いる転写翻訳共役系（Zubay G. (1973) Annu. Rev. Genet. 7, 267-287）を用い、グリシン残基を $^{15}\text{N}$ で標識したCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）を合成させた。

【0033】①大腸菌S30抽出液の調製

Zubayらの方法にしたがって、大腸菌A19株から調製した。なお、この抽出液は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下であれば比較的長期間の保存が可能であった。

【0034】②プラスミドDNA

転写翻訳共役系において、CATを効率良く発現するように作製したプラスミドDNA pACL6を用いた。

【0035】③連続無細胞蛋白質合成反応は、容量1mlの反応槽で行なった。ここに $170\mu\text{l}$ の大腸菌S30抽出液、 $100\mu\text{g}$ のプラスミドDNA、 $174\mu\text{g}$ のtRNAを入れ、基質溶液を満たした。この反応槽を $37^{\circ}\text{C}$ に加熱し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用のポンプ（東ソー社製、CCPM）を用いて基質溶液を供給した。

【0036】基質溶液としては、グリシンが $^{15}\text{N}$ により標識された標識アミノ酸を含む20種類のアミノ酸（各0.35ミリモル）、55.0ミリモル・トリス酢酸溶液（pH8.2）、1.65ミリモル・DTT、1.22ミリモルATP、0.84ミリモル・CTP・GTP・UTP、27.0ミリモル・ホスホエノールピルビン酸エステル、1.9%ポリエチレングリコール-6000、 $34.4\mu\text{g}/\text{ml}$ フォリン酸、0.64ミリモル・3',5'-サイクリックAMP、36.0ミリモル酢酸アンモニウム、72.0ミリモル酢酸カリウム、9.7ミリモル酢酸カルシウム、10.0ミリモル酢酸マグネシウムを含む溶液を用いた。この基質溶液は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存により長期保存が可能であった。

【0037】基質溶液を供給すると同時に、分画分子量10万ダルトンの限外ろ過膜YM100（アミコン社製）を通して、反応生産物（標識CAT）および反応に用いられたリボヌクレオチド、アミノ酸および分解物（AMP, GMP, 無機リン酸など）を含む流出液を反応槽から取り出した。なお、基質溶液の供給量は $2\text{ml}$

／時間に設定した。また基質溶液は約 $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0038】このようなシステムを用い、17時間にわたり無細胞蛋白質合成系により、20種類のアミノ酸のうちのグリシン残基が $^{15}\text{N}$ により標識されたCAT（安定同位体標識蛋白質）の合成を行なった。この合成終了後、アフィニティクロマトグラフィーにより流出液中のCATを精製した。

【0039】精製後のCATを6N-HClで24時間、酸加水分解し、得られたアミノ酸をTBDMSで誘導体化した後、GC-MSで各アミノ酸を分析した結果、グリシン残基のみが $^{15}\text{N}$ で標識されているのを確認



(6)

9

した。

【0040】

【発明の効果】以上説明したように、本発明は、無細胞蛋白質合成系を用い、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ などの安定同位体により標識された少なくとも1種類の標識アミノ酸を含む基質を連続的に供給して安定同位体標識蛋白質を製造することによって、蛋白質に存在する20種類のアミノ酸残基のうち、任意の特定アミノ酸残基の任意の原子だけにほぼ100%の効率で安定同位体で標識された目的の標識蛋白質を安価に製造することができる。従って、蛋白質の立体構造や機能を解析する技術などに用いる標識蛋白質を安全かつ極めて容易に製造することが可能となり、蛋白質の構造解析等の技術において寄与するところが大きい。

白質を安全かつ極めて容易に製造することが可能となり、蛋白質の構造解析等の技術において寄与するところが大きい。

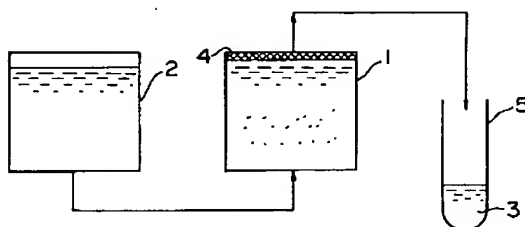
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の安定同位体標識蛋白質の製造方法を説明するための製造装置の概略構成図である。

【符号の説明】

- 1 反応槽
- 2 基質溶液タンク
- 3 流出液
- 4 限外ろ過器

【図1】



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                   | Relevant to claim No.    |
|---------------|--|--------------------------|
| <u>X</u><br>A | JP 7-203984 A (Yaeta ENDO),<br>08 August, 1995 (08.08.95),<br>Full text<br>(Family: none)            | <u>6-8</u><br>1-5, 9, 10 |
| <u>X</u><br>A | JP 5-236986 A (Nippon Sanso Corp.),<br>17 September, 1993 (17.09.93),<br>Full text<br>(Family: none) | <u>6-8</u><br>1-5, 9, 10 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 March, 2005 (24.03.05)

Date of mailing of the international search report  
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.